

0-732873 -/

На правах рукописи
УДК 574+599.323.4+504.054:621.039.7

ПАШНИНА ИРИНА АЛЕКСАНДРОВНА

**АНАЛИЗ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ И ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ
ОСОБЕННОСТЕЙ ГРЫЗУНОВ, ОБИТАЮЩИХ
В РАДИОАКТИВНОЙ СРЕДЕ**

03.00.16 - экология



**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Екатеринбург – 2003

Работа выполнена в лаборатории экспериментальной экологии
Института экологии растений и животных Уральского отделения РАН

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Любашевский Наум Моисеевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Трапезников Александр Викторович
доктор медицинских наук, профессор
Осипенко Артур Васильевич

Ведущая организация: Институт биологии Коми Научного Центра
УрО РАН

Защита диссертации состоится " 25 " марта 2003 г. в 11⁰⁰ часов
на заседании диссертационного совета Д004.005.01. при Институте экологии
растений и животных УрО РАН по адресу: 620144, г. Екатеринбург, ул. 8
Марта, 202.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института экологии
растений и животных УрО РАН

Автореферат разослан " 21 " февраля 2003 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Нифонтова М.Г.

АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ:

Изучение действия радиоактивного загрязнения среды на организм
млекопитающих является одной из важнейших задач современной экологии.
Актуальность данной проблемы определяется наличием обширных
территорий, подвергающихся повышенному воздействию ионизирующей
радиации вследствие радиационных катастроф и испытаний ядерного оружия.

К настоящему времени подробно исследован ряд популяционных и
морфофизиологических характеристик мелких млекопитающих, обитающих в
радиоактивной среде (Дубинин и др., 1976; Шевченко и др., 1993;
Кривошукский, 1996, 1999; Любашевский и др., 2000). Гораздо менее изучены
особенности состояния таких радиочувствительных систем организма как
иммунная и кроветворная. В литературе встречаются лишь фрагментарные
данные о состоянии системы иммунитета животных из природных популяций,
за исключением единственного комплексного иммунологического
исследования, проведенного на рыжей полевке в зоне аварии на
Чернобыльской АЭС (Последствия Чернобыльской катастрофы ..., 1996).
Однако имеющиеся материалы не дают полного представления о влиянии
радиоактивного загрязнения среды обитания на иммунный статус животных.
Между тем, даже немногочисленные иммунологические исследования, а
также косвенные данные (наличие структурных аномалий лейкоцитов,
цитогенетических повреждений, эмбриональных уродств у животных из
радиационных биогеоценозов) свидетельствуют о резком изменении режима
функционирования иммунной системы. Чувствительность системы
иммунитета млекопитающих к радиоактивному загрязнению среды
подтверждают результаты медицинских и ветеринарных работ (Петров и др.,
1991; Орадовская и др., 1995; Донник, 1997; Алексахин и др., 2001; Bloom et
al., 1987; Nussbaum, Rohnlein, 1994). Высокая реактивность иммунной системы
позволяет использовать иммунологические показатели для мониторинга
популяций техногенно нарушенных территорий и оценки здоровья среды.

Многочисленные сдвиги в системе гемопоза грызунов с загрязненных
территорий, по мнению некоторых исследователей, служат основой для
пессимальной оценки будущего популяций, обитающих в радиационной среде
(Богатов, Мартюшов, 1999; Материй, Таскаев, 1999). Однако численность
грызунов на радиоактивных участках постоянно поддерживается на уровне
"чистых" территорий (Ильенко, 1974; Соколов и др., 1993; Тестов, 1993;
Любашевский и др., 2000; Тарасов, 2000). Таким образом, проблема прогноза
судьбы радиогенных популяций не решена, как и связанная с ней проблема
радиоадаптации, которой посвящено большое количество работ (Раушенбах,
Монастырский, 1966; Ильенко; Крапивко, 1989; Любашевский и др., 2001). С
этой точки зрения представляется перспективным исследование системы
иммунитета, как одной из систем, поддерживающих гомеостаз организма. Для
более полной оценки влияния радиоактивного загрязнения окружающей
среды целесообразно изучение иммунореактивности экологически разных
видов по единой методической схеме.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ: Анализ иммунологических и гематологических особенностей грызунов с разной экологической спецификой, обитающих на территории Восточно-Уральского радиоактивного следа (ВУРСа).

ЗАДАЧИ:

1. Исследовать иммунный статус грызунов по показателям клеточного и гуморального иммунитета и системы естественной резистентности организма.
2. Оценить функциональные резервы иммунной системы животных.
3. Изучить состояние лейкоцитарного и эритроидного звена гемопоэтической системы грызунов.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА:

Впервые по единой методической схеме проведен комплексный анализ состояния иммунной и гемопоэтической систем экологически контрастных видов грызунов, обитающих в головной части ВУРСа.

Показано, что изменения в иммунном статусе лесных мышей, обитающих на участке с уровнем радиоактивного загрязнения почвы по ^{90}Sr – 15-20 МБк/м² (400-540 Ки/км²), затрагивают клеточный и гуморальный иммунитет и систему естественной резистентности организма. Выявлен дисбаланс в эритроидном и лейкоцитарном звеньях кроветворной системы этих животных. Обнаружено, что влияние радионуклидного загрязнения среды превалирует над географическими различиями по комплексу иммунологических и гематологических показателей лесных мышей. С помощью дополнительной антигенной нагрузки установлено, что резервные возможности иммунной системы полевых мышей из головной части ВУРСа (15-20 МБк/м²) снижены.

Впервые определены иммунологические и гематологические показатели обыкновенных слепушенок в норме и в условиях радиоактивного загрязнения. Показано благополучное состояние иммунной и кроветворной систем слепушенок с ВУРСа (35-39 МБк/м² – 950-1050 Ки/км²).

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ:

Полученные данные расширяют представление о влиянии радиоактивного загрязнения окружающей среды на организм мелких млекопитающих. В частности показано, что эффекты воздействия ионизирующего излучения в ряду поколений на виды с разной экологической специализацией сильно различаются. Возможно использование материалов работы для экстраполяции с мелких млекопитающих на человека.

Результаты диссертационной работы могут быть использованы при оценке состояния биоты радиоактивно-загрязненных территорий. Иммунологические показатели более перспективны для достижения этой цели, чем гематологические и морфологические, поскольку в меньшей

степени подвержены половозрастным, сезонным, межгодовым колебаниям. Показано, что для более полной и достоверной оценки радиационного воздействия на природные популяции целесообразно использовать экологически разные виды.

Материалы работы включены в лекционные курсы на биологическом факультете Уральского Государственного Университета и на естественно-технологическом факультете Челябинского Государственного Педагогического Университета.

ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ:

1. Радионуклидное загрязнение среды обитания (15-20 МБк/м² – 400-540 Ки/км²) вызывает значительные сдвиги в иммунном статусе лесных мышей и снижение резервных возможностей иммунной системы полевых мышей.
2. Система иммунитета обыкновенных слепушенок из зоны 35-39 МБк/м² (950-1050 Ки/км²) имеет функциональные резервы, признаки угнетения иммунореактивности отсутствуют.
3. Хроническое воздействие ионизирующей радиации в ряду поколений вызывает дисбаланс в эритроидном и лейкоцитарном звеньях системы кроветворения лесных мышей и приводит к качественным (морфологическим) сдвигам.
4. В состоянии гемопоэтической системы обыкновенных слепушенок, обитающих в головной части ВУРСа, отсутствуют признаки патологических изменений

АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ:

Основные положения диссертационного исследования доложены на Всероссийской научной молодежной конференции "Стратегия природопользования и сохранения биоразнообразия в XXI веке" (Оренбург, 1999); научной конференции "Проблемы экологии и экологического образования Челябинской области" (Челябинск, 2000); конференции молодых ученых "Биосфера и человечество" (Екатеринбург, 2000); межрегиональной научной конференции "Проблемы отдаленных эколого-генетических последствий радиационных инцидентов: Токский ядерный взрыв" (Екатеринбург, 2000); I региональной научной конференции "Адаптация биологических систем к естественным и экстремальным факторам среды" (Челябинск, 2001); конференции молодых ученых "Современные проблемы популяционной, исторической и прикладной экологии" (Екатеринбург, 2001); I молодежной научно-практической конференции "Ядерно-промышленный комплекс Урала: проблемы и перспективы" (Озерск, 2001); конференции молодых ученых "Биота горных территорий: история и современное состояние" (Екатеринбург, 2002); международной научной конференции "Экологические проблемы горных территорий" (Екатеринбург, 2002), региональной научно-практической конференции "ВУРС-45" (Озерск, 2002).

ПУБЛИКАЦИИ: По материалам диссертации опубликовано 16 работ.

СТРУКТУРА И ОБЪЕМ РАБОТЫ: Диссертация состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов и приложения, изложена на **179** страницах, содержит 5 рисунков и 37 таблиц. Список литературы включает 257 источников, из них 51 на иностранных языках.

ГЛАВА 1. ВЛИЯНИЕ РАДИОАКТИВНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ НА ОРГАНИЗМ МЛЕКОПИТАЮЩИХ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).

Анализ литературы выявил недостаток данных о состоянии системы иммунитета животных из природных популяций. Обнаружено противоречие между постоянной высокой численностью грызунов на радиоактивно загрязненных территориях и многочисленными физиологическими и цитогенетическими сдвигами у этих животных.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

Исследования проведены на контрастных по экологической специфике видах: мышах (малая лесная мышь (*Apodemus (Sylvaeus) uralensis* Pall. 1811), полевая мышь (*Apodemus agrarius* Pall. 1771)) и обыкновенной слепушонке (*Ellobius talpinus* Pall. 1770). Полевая и лесная мышь являются наземными, активно мигрирующими видами (Громов, Ербаева, 1995). Обыкновенная слепушонка ведет оседлый норный образ жизни, отличается крайне малой способностью к расселению и характеризуется большей продолжительностью жизни по сравнению с другими мышевидными грызунами (Евдокимов, 2001). Всего в экспериментах использовано 210 особей, отловленных в 1999-2001 гг. Мышей отлавливали в головной части ВУРСа на участке с уровнем загрязнения почвы по ^{90}Sr 15-20 МБк/м² (400-540 Ки/км²), слепушонок – на участке с уровнем загрязнения 35-39 МБк/м² (950-1050 Ки/км²) (Тарасов, 2000). В качестве контрольных использовали животных с территорий, не входящих в зону ВУРСа. Было отловлено по одной контрольной выборке полевых мышей и обыкновенных слепушонок и две контрольные выборки лесных мышей: 1-й контроль географически близок к головной части ВУРСа (7 км до оси следа), 2-й контроль удален на расстояние свыше 70 км.

Оценка иммунного статуса. Клеточный иммунитет: количество Т-лимфоцитов (розеткообразующие клетки общие, РОК), Т-хелперов (РОК ранние) и Т-цитотоксических (РОК восстановленные) (Лозовой и др., 1986). Гуморальный иммунитет: количество В-лимфоцитов методом РОК (Лозовой и др., 1986); уровень циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в реакции преципитации с полиэтиленгликолем 6000. Система естественной резистентности организма: фагоцитарная активность нейтрофилов с частицами латекса диаметром 1,5 мкм, определяли процент фагоцитирующих нейтрофилов (%ФН), фагоцитарное число (ФЧ), индексы стимуляции продигозаном (ИС) %ФН и ФЧ (Маянский и др., 1977; Медведев, Чаленко,

1991); удельная активность пероксидазы гранулоцитов с помощью индигокарминового метода (УАПГ) (Попов, Нейковска, 1971; Лазорик, 1987); уровень активности комплемента в реакции гемолиза (Турищев, 1986). Функциональный нагрузочный тест: вакцинация животных поливалентной сухой вирусной вакциной крупного рогатого скота "Тривак".

Гематологические исследования проведены по стандартным методикам (Лабораторные методы исследования..., 1987). Эритроидное звено: абсолютное количество эритроцитов; доля ретикулоцитов; миелограмма. Лейкоцитарное звено: абсолютное количество лейкоцитов, тимоцитов, миелокариоцитов и спленоцитов; лейкоцитарная формула; миелограмма.

Морфофизиологические показатели: масса и промеры тела, индексы печени, почки, надпочечника, сердца, селезенки, тимуса (Шварц и др., 1968).

Микроядерный тест проводили стандартным методом (Оценка мутагенной активности..., 1984).

Всего при исследовании физиологического состояния животных использовано 20 методик, для каждого животного определено от 32 до 77 показателей.

Методы анализа данных: Для сравнения выборок по показателям с распределением, не отличающимся от нормального, использовали ковариационный анализ. Удобством этого метода является повышение точности анализа эффекта исследуемого фактора путем учета эффектов сопутствующих факторов (ковариат). В качестве ковариат использованы пол, возраст, репродуктивный статус, год и сезон отлова и время содержания в виварии. После оценки влияния ковариат вычисляли скорректированные средние, то есть такие средние, которые получаются после удаления всех эффектов ковариат (Афифи, Эйзен, 1982). Различия по скорректированным средним обусловлены влиянием межгруппового фактора. Показатели, имеющие негауссовское распределение, анализировали с помощью критерия Краскела-Уоллиса. Многомерное сравнение выборок проводили посредством пошагового дискриминантного анализа.

Отлов животных проведен сотрудниками ИЭРиЖ. Титр специфических антител к вирусам вакцины определен д.в.н. Петровой О.Г. (ГУ СНИВС РАСХН). Подсчет миелограммы проведен к.б.н. Андреевой О.Г. (ЧГПУ).

ГЛАВА 3. ОЦЕНКА ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ЛЕСНЫХ И ПОЛЕВЫХ МЫШЕЙ, ОБИТАЮЩИХ В ГОЛОВНОЙ ЧАСТИ ВУРСА И НА КОНТРОЛЬНЫХ УЧАСТКАХ.

При сравнении морфофизиологических показателей лесных мышей из головной части ВУРСа с объединенным контролем выявлено увеличение индексов печени, почки и селезенки и снижение индекса тимуса. Различий по количеству миелокариоцитов, спленоцитов и тимоцитов не обнаружено. Показано значимое снижение количества эритроцитов и ретикулоцитов у мышей из головной части ВУРСа (табл. 1). Однако в миелограмме этих

животных количество эритробластов, базофильных и оксифильных нормобластов выше, чем в контроле ($p < 0,05$). Такой диссонанс между показателями красной крови, а также снижение индекса созревания эритроцитов ($p < 0,001$) свидетельствуют о задержке созревания эритроидных клеток в костном мозге. Увеличение относительной массы селезенки может являться компенсаторной реакцией на недостаточность эритроидного роста костного мозга.

У мышей из радиационного биогеоценоза снижена доля сегментоядерных нейтрофилов периферической крови (табл. 1). В мислограмме доля промиелоцитов и индекс созревания нейтрофилов (ИСН) были ниже контрольных значений ($p < 0,05$), а доля миелобластов – выше ($p < 0,001$). Снижение ИСН и содержания сегментоядерных нейтрофилов в крови указывает на задержку выхода зрелых нейтрофильных клеток в кровь из костного мозга.

Таблица 1

Показатели периферической крови лесных мышей

Показатель	Скорректированные средние		MS _B	MS _R	F (1, 103)	p
	ВУРС, n=69	Контроль, n=45				
Эритроциты, $\cdot 10^6$ /мкл	8,20	9,45	24,64	2,49	9,89	0,002
Ретикулоциты, %	1,0 ^a	1,3 ^a	1,52	0,10	16,01	0,000
Лейкоциты, $\cdot 10^3$ /мкл	1,76 ^a	1,65 ^a	0,28	0,08	3,50	0,064
Эозинофилы, %	2,0 ^b	0,5 ^b	–	–	–	0,000
Палочкоядерные нейтрофилы, %	1,6 ^a	1,6 ^a	0,11	0,54	0,21	0,650
Сегментоядерные нейтрофилы, %	2,0 ^a	2,5 ^a	4,55	0,52	8,83	0,004
Моноциты, %	0,8 ^a	0,9 ^a	0,17	0,19	0,91	0,343
Лимфоциты, %	4,3 ^a	4,3 ^a	0,06	0,03	1,90	0,171
Малые лимфоциты, %	4,1 ^a	4,5 ^a	3,76	0,33	11,41	0,001
Плазмоциты, %	1,0 ^b	0,0 ^b	–	–	–	0,002
Аномальные лейкоциты, %	2,0 ^b	0,0 ^b	–	–	–	0,000

Примечания: ^a – данные логарифмированы

^b – анализ данных проведен с помощью критерия Краскела-Уоллиса, в графе "Скорректированные средние" приведены медианы

Обнаружено увеличение количества эозинофилов периферической крови у зверьков из импактной зоны (табл. 1), что свидетельствует об аллергических реакциях, глистных инвазиях. У некоторых животных наблюдается выраженная эозинофилия – до 16%, (в контроле – не более 5%). Выявлено снижение доли малых лимфоцитов, которые являются наиболее активными иммунокомпетентными клетками (Говалло и др., 1987). Установлено увеличение доли плазматических клеток, что указывает на

антигенную стимуляцию организма.

В лейкоцитарной формуле крови мышей из импактной зоны обнаружено существенное увеличение числа аномальных лейкоцитов (табл. 1). Структурные аномалии затронули в основном лимфоидные клетки, в меньшей степени – моноцитарные и нейтрофильные. Появление незрелых лимфоцитов и лимфобластов в кровотоке свидетельствует о напряжении лимфопоэза. Наличие двуядерных лимфоцитов, клеток с фрагментацией ядра, ядерными протуберанцами можно классифицировать как результат нарушений митоза.

В экспериментальных условиях детерминированные эффекты хронического облучения малыми дозами радиации возникают в системе гомеостатической регуляции при накопленной дозе в десятки Гр (Шибкова, 2000). Многочисленные сдвиги в кроветворении лесных мышей из головной части ВУРСа не соответствуют получаемым дозовым нагрузкам. Так, средняя концентрация ^{90}Sr в костной ткани этих животных составляет 161 ± 29 Бк/г (Стариченко, 2002), кумулятивные дозы находятся в пределах от 0,07 до 1,50 Гр (Любашевский и др., 2003). Данное несоответствие можно объяснить накоплением генетического груза в ряду поколений мышевидных грызунов (Любашевский и др., 2000).

Таблица 2

Иммунологические показатели лесных мышей

Показатель	ВУРС		Контроль		MS _B	MS _R	F	df	p
	CC ^b	n	CC ^b	n					
Т-лимфоциты, %	54,3	70	54,9	45	9,18	95,79	0,10	101	0,757
В-лимфоциты, %	11,9	70	11,3	45	0,03	0,14	0,24	101	0,626
Т-хелперы, %	3,0 ^a	30	3,3 ^a	28	0,96	0,05	21,11	50	0,000
Т-цитотоксические, %	22,5	30	20,6	29	47,74	23,04	2,07	50	0,156
Регуляторный индекс	0,9	30	1,4	28	1,93	0,05	38,13	50	0,000
%ФН, %	2,68 ^a	67	2,69 ^a	43	0,00	0,12	0,04	50	0,845
ФЧ, у.е.	3,41	67	3,48	43	0,02	0,08	0,19	97	0,667
ИС %ФН	0,21 ^a	66	0,27 ^a	43	0,09	0,07	1,31	97	0,256
ИС ФЧ	-0,09 ^a	66	0,06 ^a	43	0,44	0,07	6,30	97	0,014
УАПГ, ммоль/мин $\cdot 10^6$	5,8 ^a	58	6,1 ^a	34	1,43	0,35	4,06	82	0,047
ЦИК, у.е.	56,7	70	35,6	45	10596,6	1877,2	5,64	104	0,019
Активность комплемента, у.е.	32,1	70	22,3	45	2320,8	393,4	5,90	104	0,017

Примечания: ^a – данные логарифмированы

^b – скорректированные средние

При оценке иммунного статуса выявлено снижение доли Т-хелперов у зверьков из импактной зоны (табл. 3), свидетельствующее о нарушении

клеточной кооперации. Значение регуляторного индекса (Т-хелперы/Т-цитотоксические) у этих животных меньше единицы, что является признаком развития иммунодефицитного состояния. Снижение индекса стимуляции ФЧ и удельной активности пероксидазы гранулоцитов (УАПГ) указывает на недостаточность резервов фагоцитарной системы и снижение функциональной активности нейтрофилов. Обнаружено значительное увеличение уровня ЦИК, обусловленное повышенной антигенной нагрузкой на организм животных. Активность комплемента сыворотки крови была выше, чем в контрольной выборке (табл. 3).

Влияние ковариат (пола, возраста, репродуктивного статуса, года и сезона отлова, времени содержания в виварии) в наибольшей степени сказывается на морфофизиологических, в меньшей степени – на гематологических и в весьма низкой – на иммунологических показателях лесных мышей. Достоверная связь между ковариатами и исследованными показателями выявлена в 43%, 18% и 6% случаев соответственно. Можно заключить, что иммунологические тесты являются более надежным критерием общего состояния животных, так как они в наименьшей степени зависят от исследованных факторов и, в то же время, чутко реагируют на хроническое воздействие ионизирующей радиации.

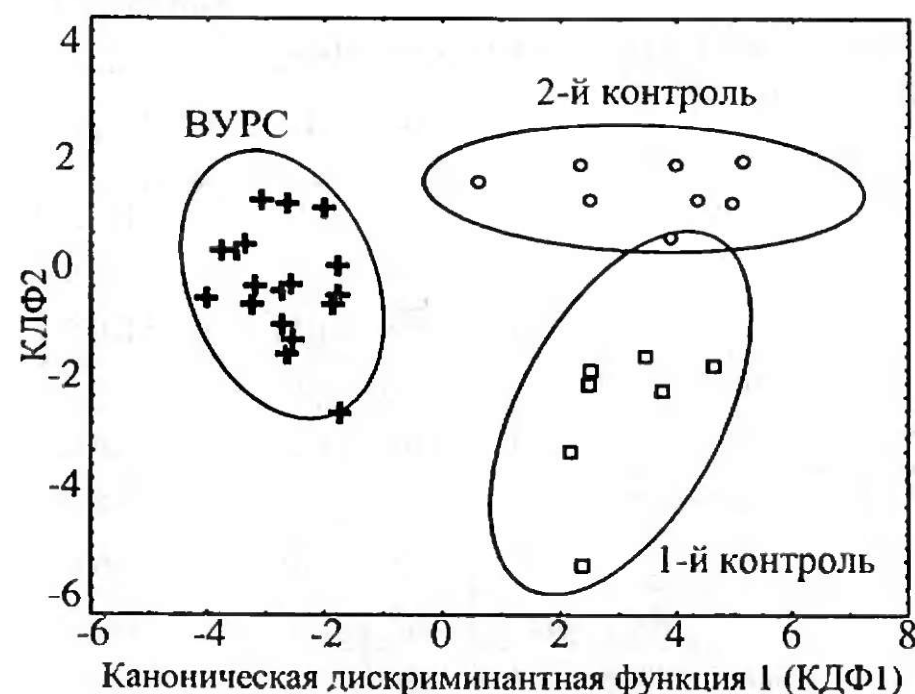


Рис. 1. Расположение выборок лесных мышей, проекции на плоскость дискриминантных функций (95% доверительные эллипсиды).

диоактивного загрязнения участков отлова (рис. 1). Это подтверждается результатами регрессионного анализа: выявлена связь между значением КДФ1 и плотностью загрязнения почвы по ^{90}Sr ($\beta = -0,93$; $p < 0,001$). КДФ2 в основном отражает географическую изменчивость ($\beta = 0,38$; $p < 0,05$) и в меньшей степени связана с уровнем загрязнения ($\beta = 0,18$; $p < 0,05$). Животные с ВУРС

По комплексу иммунологических и гематологических показателей неполовозрелых сеголеток лесной мыши проведен дискриминантный анализ. Полученная модель обеспечила 100% верную классификацию особей. Изменчивость по первой канонической дискриминантной функции (КДФ1), объясняющей 82% межгрупповой дисперсии, связана с уровнем ра-

существенно отличаются от зверьков из контрольных выборок ($p < 0,001$). Наименьшие различия выявлены между первым и вторым контролем, несмотря на их пространственную удаленность ($p < 0,05$). Таким образом, влияние радиоактивного загрязнения среды обитания на иммунологические и гематологические показатели лесных мышей сочетается с географической изменчивостью, но фактор загрязнения более мощный.

Выявлено статистически значимое увеличение частоты встречаемости микроядер в полихроматофильных эритроцитах костного мозга у лесных мышей с ВУРСа ($n=12$) – $5,3 \pm 0,69\%$ по сравнению с контрольными животными ($n=11$) – $1,8 \pm 0,30\%$ ($p < 0,001$).

Проведено исследование противинфекционного иммунитета полевых мышей с помощью вакцинальной нагрузки. Уровень антител, выработанный в ответ на антигенную стимуляцию, характеризует состояние иммунной системы в целом, так как для антителопродукции необходима кооперация иммунокомпетентных клеток (Петров, 1983). У мышей из импактной зоны средний титр антител к вирусам вакцины находился на нижней границе нормы (1:2) и был достоверно ниже, чем у контрольных животных (1:4, $p < 0,05$). В контрольной выборке увеличен индекс селезенки, являющейся лимфоидным органом, что свидетельствует об активном иммунном ответе организма. Таким образом, контрольные зверьки более адекватно реагируют на введение вакцины, чем мыши из головной части ВУРСа. Также как и у лесных мышей, в формуле крови полевых мышей из импактной зоны обнаружено увеличение доли аномальных лейкоцитов (до и после вакцинации). По-видимому, морфологические изменения лейкоцитов являются одними из наиболее характерных сдвигов при воздействии радиоактивного загрязнения окружающей среды.

Можно заключить, что у лесных мышей, обитающих в головной части ВУРСа, выявлены признаки иммунной недостаточности: снижение регуляторного индекса, доли малых лимфоцитов, резервных возможностей фагоцитов. Нарушения в иммунном статусе привели к уменьшению элиминации поврежденных клеточных элементов – аномальных лейкоцитов и эритроцитов с микроядрами. Обнаружен дисбаланс в системе кроветворения. С помощью вакцинальной нагрузки показано снижение функциональных возможностей иммунной системы полевых мышей.

ГЛАВА 4. ИММУННАЯ И КРОВЕТВОРНАЯ СИСТЕМЫ ОБЫКНОВЕННЫХ СЛЕПУШОНОК ИЗ РАДИАЦИОННОГО БИОГЕОЦЕНОЗА И С КОНТРОЛЬНОЙ ТЕРРИТОРИИ. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ.

Концентрация ^{90}Sr в костной ткани обыкновенных слепушонок из головной части ВУРСа находятся в диапазоне от 225 до 1652 Бк/г (Стариченко, в печати), накопленные дозы составляют 0,33-29,63 Гр за жизнь (Любашевский и др., 2003). Основные результаты анализа

морфофизиологических показателей свидетельствуют, что индекс сердца у животных из импактной зоны выше, чем в контрольной выборке, а индекс тимуса – ниже. По гематологическим показателям выявлено только одно различие: количество лейкоцитов у слепушонок из головной части ВУРСа было меньше, чем у контрольных зверьков (табл. 3). Количество кариоцитов кроветворных органов, эритроидные показатели, лейкоцитарная формула крови в исследованных группах животных не различались.

Таблица 3

**Гематологические и иммунологические показатели
обыкновенных слепушонок**

Показатель	Скорректированные средние		MS _B	MS _R	F (1, 38)	p
	ВУРС, n=28	Контроль, n=16				
Эритроциты, *10 ⁶ /мкл	8,85	9,74	2,88	2,83	1,02	0,320
Ретикулоциты, %	3,3	2,2	4,49	1,17	3,83	0,058
Лейкоциты, *10 ³ /мкл	1,78^a	2,33^a	1,07	0,09	11,81	0,001
Эозинофилы, %	1,0 ^b	2,0 ^b	–	–	–	0,213
Палочкоядерные нейтрофилы, %	18,0	26,3	245,03	111,88	2,19	0,147
Сегментоядерные нейтрофилы, %	24,1	25,7	8,35	96,93	0,09	0,771
Моноциты, %	1,0 ^b	1,0 ^b	–	–	–	0,202
Лимфоциты, %	55,7	42,4	632,57	245,23	2,58	0,117
Малые лимфоциты, %	91,8	58,9	3882,0	172,9	22,45	0,000
Плазмоциты, %	0,0 ^b	0,0 ^b	–	–	–	0,467
Аномальные лейкоциты, %	0,0 ^b	0,0 ^b	–	–	–	0,209
Т-лимфоциты, %	55,7	59,8	60,43	40,03	1,51	0,227
В-лимфоциты, %	9,7	10,5	2,11	5,34	0,40	0,533
Т-хелперы, %	25,2	26,9	10,77	13,78	0,78	0,382
Т-цитотоксические, %	19,6	15,7	55,38	20,10	2,76	0,105
Регуляторный индекс	1,35	1,72	0,48	0,08	6,04	0,019
%ФН, %	12,6	16,7	61,82	16,03	3,86	0,057
ФЧ, у.е.	2,87	2,65	0,18	0,55	0,32	0,577
ИС %ФН	1,36	1,09	0,26	0,05	5,09	0,030
ИС ФЧ	0,17 ^a	0,21 ^a	0,01	0,06	0,09	0,767
УАПГ, мМоль/мин*10 ⁶	125,1	55,7	17238,2	2582,1	6,68	0,014
Активность комплемента, у.е.	94,5 ^b	95,3 ^b	–	–	–	0,678

Примечания: ^a – данные логарифмированы

^b – анализ данных проведен с помощью критерия Краскела-Уоллиса, в графе "Скорректированные средние" приведены медианы

Увеличение доли малых лимфоцитов в лимфограмме слепушонок с ВУРСа указывает на активацию иммунной системы (табл. 3). При оценке клеточного иммунитета этих животных значимо сниженным оказался только регуляторный индекс. Однако его средняя величина больше единицы, что указывает на незначительные изменения в иммунной системе и не позволяет говорить о развитии иммунодефицита. Анализ факторов естественной резистентности организма показал, что ИС %ФН и УАПГ существенно выше у зверьков из головной части ВУРСа. Следовательно, их фагоцитарная система активирована и имеет значительные функциональные резервы. Уровень активности комплемента у животных из разных выборок не различался.

Влияние ковариат на морфофизиологические, гематологические и иммунологические показатели обыкновенных слепушонок невелико и выражено в равной степени (в 10-11% случаев).

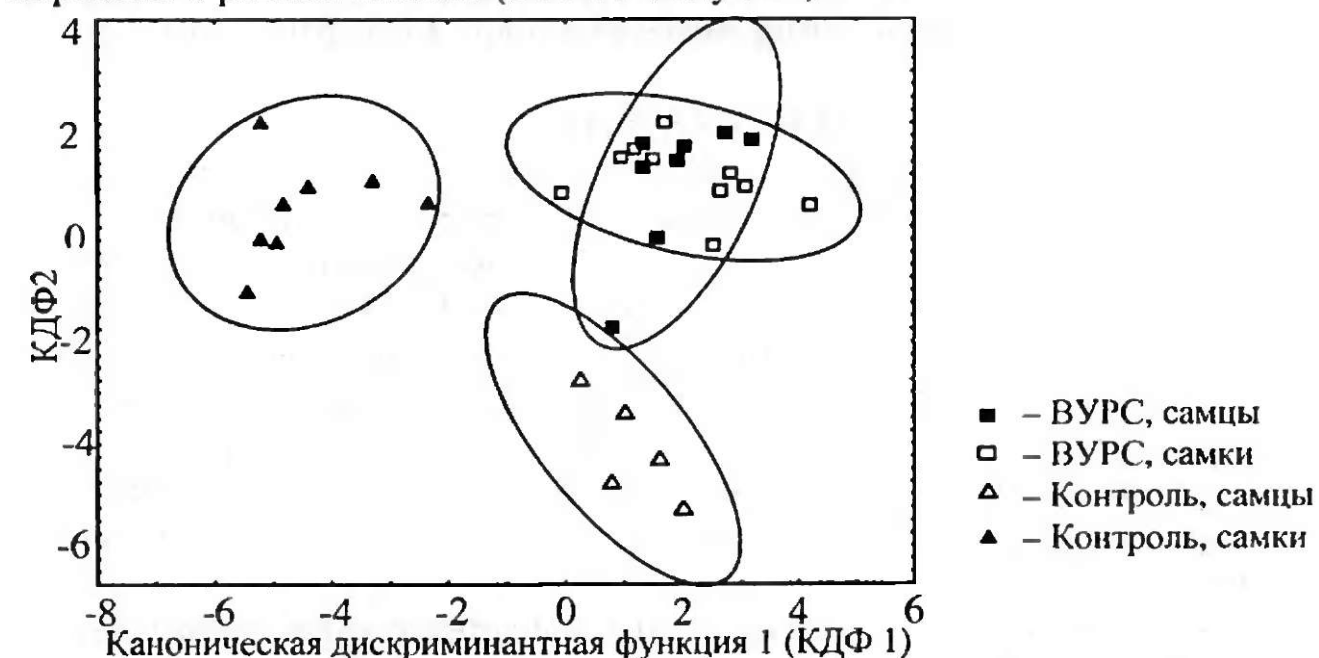


Рис. 2. Расположение выборок обыкновенных слепушонок, проекции на плоскость дискриминантных функций (95% доверительные эллипсоиды).

По комплексу иммунологических и гематологических данных неполовозрелых сеголеток обыкновенной слепушонки проведен дискриминантный анализ, показатели самцов и самок анализировались отдельно (рис. 2). КДФ1 и КДФ2, как показано с помощью регрессионного анализа, в большей степени связаны с уровнем радиоактивного загрязнения почвы и в меньшей – с различиями по полу ($p < 0,05$). КДФ3 не значима. Установлено, что самки из радиационного биогеоценоза отличаются от контрольных животных обоего пола ($p < 0,05$). Самцы из импактной зоны отличаются только от самок с контрольного участка ($p < 0,01$). Таким образом, выборки с ВУРСа и контрольной территории не разделяются в полной мере даже с помощью многомерного анализа. Кроме того, на воздействие радиоактивного загрязнения может накладываться географическая изменчивость, поскольку участки отлова удалены друг от друга на значительное расстояние – более 40 км.

Оценка противинфекционного иммунитета слепушонок с ВУРСа и контрольного участка с помощью вакцинальной нагрузки показала, что иммунный ответ всех животных был достаточен для выработки диагностического титра антител. Средний титр не различался и составлял 1:8 в обеих выборках. Полученные данные свидетельствуют, что иммунная система исследованных животных обладает функциональными резервами и способна поддерживать гомеостаз организма в условиях дополнительного внешнего воздействия.

Таким образом, иммунологические и гематологические показатели обыкновенных слепушонок из импактной зоны практически не отличаются от контрольных значений. В целом состояние иммунной и кроветворной систем можно признать удовлетворительным, патологических сдвигов не обнаружено. Это согласуется с результатами цитогенетических исследований: выявлена устойчивость генома обыкновенных слепушонок из головной части ВУРСа к кластогенному воздействию ионизирующей радиации (Гилева и др., 2002).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявлено несоответствие между величиной сдвигов в иммунной и кроветворной системах разных видов грызунов с территории ВУРСа и дозой хронического облучения этих животных. У обыкновенных слепушонок, получающих значительные дозовые нагрузки (0,33-29,63 Гр), практически не обнаружены различия с животными из контрольной выборки по иммунологическим и гематологическим показателям. В то же время у мышей, накопленная доза которых ниже (0,07 до 1,50 Гр), произошли значительные изменения в исследованных системах. Обнаруженные у мышей эффекты воздействия ионизирующей радиации, в особенности морфологические, качественные нарушения (увеличение частоты структурных аномалий лейкоцитов и эритроцитов с микроядрами), свидетельствуют о накоплении генетического груза в ряду поколений, так как индивидуальная доза этих животных весьма невелика. Даже в десятки раз большие дозы облучения в экспериментальных условиях не приводят к подобным патологическим сдвигам (Шибкова и др., 2000).

Несоразмерность дозы и эффектов длительного хронического облучения усиливается тем, что природная радиочувствительность обыкновенных слепушонок существенно выше, чем у подавляющего большинства представителей отряда Rodentia. Так, интегральный показатель радиочувствительности ($LD_{50/30}$) для лесных и полевых мышей составляет $7,0 \pm 0,4$ Гр и $10,0 \pm 0,2$ Гр соответственно, а для обыкновенных слепушонок находится в интервале 5,5-6,0 Гр (Григоркина, 1998, 2003). Кроме того, слепушонки приступают к размножению в более позднем возрасте, чем большинство мышевидных грызунов (Евдокимов, 2000). Соответственно, они накапливают к наступлению репродуктивного периода большую дозу облучения, что способствует накоплению генетического груза. Наиболее вероятным объяснением отсутствия выраженных изменений в иммунной и

кроветворной системах этих животных является развитие радиоадаптации. Этому способствует значительная изолированность поселения слепушонок за счет оседлости, присущей этому виду.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что радиоактивное загрязнение среды обитания вызывает многочисленные сдвиги в иммунной и кроветворной системах, а также увеличение частоты встречаемости микроядер в полихроматофильных эритроцитах костного мозга у лесных мышей.
2. Выявлено, что иммунологические показатели лесных мышей более информативны для биоиндикации радиоактивных загрязнений, чем гематологические и морфофизиологические, так как они в наименьшей степени зависят от пола, репродуктивного статуса, возраста животных, года и сезона отлова, времени содержания в виварии.
3. Показано, что различия между выборками лесных мышей из головной части ВУРСа и двух контрольных участков в большей степени обусловлены воздействием радионуклидного загрязнения среды и в меньшей – географической изменчивостью.
4. Обнаружено, что функциональные резервы иммунной системы полевых мышей из головной части ВУРСа снижены.
5. Выявлено, что в состоянии иммунной и кроветворной систем обыкновенных слепушонок, обитающих на ВУРСе, отсутствуют патологические сдвиги и признаки угнетения реактивности.
6. Сопоставление результатов иммунологических и гематологических исследований, проведенных на экологически контрастных видах, и дозовых нагрузок, полученных исследованными животными, свидетельствует о развитии радиоадаптации у оседлого норного вида – обыкновенной слепушонки.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Любашевский Н.М., Григоркина Е.Б., Лукьянов О.А., Пашнина И.А., Потапов В.А., Расина Л.Н., Стариченко В.И., Чибиряк М.В. О природе наследуемых преадаптаций к экстремальным воздействиям среды у млекопитающих // Тез. докл. VI съезда териологического общества. М., 1999. С. 145.
2. Пашнина И.А., Потапов В.А. Особенности системы кроветворения мелких млекопитающих, обитающих на территории Восточно-Уральского радиационного следа // Стратегия природопользования и сохранения биоразнообразия в XXI веке: Материалы Всеросс. науч. молодеж. конф. Оренбург, 1999. С. 81.
3. Пашнина И.А., Потапов В.А. Особенности системы кроветворения лесных мышей, обитающих на территории Восточно-Уральского радиоактивного следа // Проблемы экологии и экологического образования Челябинской области: Материалы конф. Челябинск, 2000. С. 77-80.

4. Пашнина И.А. Гематологические, иммунологические и цитогенетические особенности лесных мышей, обитающих на территории Восточно-Уральского радиоактивного следа // Биосфера и человечество: Сб. тр. конф. молодых ученых. Екатеринбург, 2000. С. 194-199.
5. Любашевский Н.М., Чибиряк М.В., Тарасов О.В., Пашнина И.А., Григоркина Е.Б., Стариченко В.И., Расина Л.Н. Жизнеспособность популяций мелких млекопитающих в радиационной и экотоксичной среде // Проблемы отдаленных эколого-генетических последствий радиационных инцидентов: Тоцкий ядерный взрыв: Материалы Межрегион. науч. конф. Екатеринбург, 2000. С. 54-66.
6. Пашнина И.А. Особенности гемопоэза мелких грызунов, обитающих на радиоактивно-загрязненной территории // Адаптация биологических систем к естественным и экстремальным факторам среды: Материалы I регион. конф. Челябинск, 2001. С. 44-50.
7. Пашнина И.А. Состояние иммунитета лесных мышей, обитающих в условиях радионуклидного загрязнения // Современные проблемы популяционной, исторической и прикладной экологии: Материалы конф. молодых ученых. Екатеринбург, 2001. С. 173-177.
8. Пашнина И.А. Последствия радиоактивного загрязнения среды для системы кроветворения мелких грызунов // Ядерно-промышленный комплекс Урала: проблемы и перспективы: Тез. докл. первой молодеж. науч.-практ. конф. Озерск, 2001. С. 26-27.
9. Пашнина И.А., Любашевский Н.М. Состояние противои инфекционного иммунитета у грызунов из района Кыштымской аварии // IV Съезд по радиационным исследованиям: (Радиобиология, радиоэкология и радиационная безопасность): Тез. докл. М., 2001. С. 164.
10. Пашнина И.А. Гематологические и иммунологические показатели лесных мышей из района радиоактивного загрязнения // Урал атомный, Урал промышленный: Тез. докл. IX Междунар. симп. Екатеринбург, 2001. С. 116-118.
11. Пашнина И.А., Петрова О.Г. Противои инфекционный иммунитет полевых мышей, обитающих на радиоактивно-загрязненной территории // Ветеринарный врач. 2002. № 1 (9). С. 69-72.
12. Пашнина И.А., Синева Н.В. Физиологические особенности обыкновенной слепушонки из радиационной среды // Биота горных территорий: История и современное состояние: Материалы конф. молодых ученых. Екатеринбург, 2002. С. 137-141.
13. Пашнина И.А., Андреева О.А., Кшнясев И.А. Кроветворение малой лесной мыши в условиях радионуклидного загрязнения // Адаптация биологических систем к естественным и экстремальным факторам среды: Материалы II регион. науч. конф. Челябинск, 2002. С. 23-29.
14. Пашнина И.А., Петрова О.Г. Состояние иммунного ответа обыкновенной слепушонки из района радиоактивного загрязнения // Адаптация биологических систем к естественным и экстремальным факторам среды:

- Материалы II регион. науч. конф. Челябинск, 2002. С. 29-35.
15. Любашевский Н.М., Стариченко В.И., Гилева Э.А., Евдокимов Н.Г., Орехова Н.А., Пашнина И.А., Расина Л.Н., Синева Н.В., Тарасов О.В., Ялковская Л.Э. Новые материалы по популяционно-генетической радиоадаптации мелких млекопитающих на ВУРСе // Экологические проблемы горных территорий: Материалы междунар. науч. конф. Екатеринбург, 2002. С. 244-249.
 16. Любашевский Н.М., Пашнина И.А., Тарасов О.В. Оценка здоровья среды в окрестностях города Озерска: (Данные биоиндикации) // ВУРС-45: Тр. и материалы регион. науч.-практ. конф. Озерск, 2002. С. 167-187.